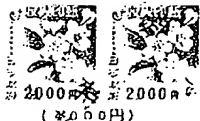


優先権主張出願

イスラエル国

出願日 1975年4月10日

出願番号 第47062号



特許願 (特許法第38条に於ける
の規定による特許出願)

昭和51年4月9日

特許庁長官 片山石郎殿

1. 発明の名称 移植片調製方法

2. 特許請求の範囲に記載された発明の数 5

3. 発明者

住所 イスラエル国 レホヴオス ネーブ・マツツ・12

氏名 イスラエル・シエクター

4. 特許出願人

住所 イスラエル国、レホヴオス(番地なし)

名称 イミューダ・リサーチ・アンド・デベロップメント・カンパニー

代表者 エスター・シロミット

国籍 イスラエル国

5. 代理人 大阪市北区万才町43番地 浪速ビル
電話(大阪) 66-312 3123・7665・361・3800
6200 吉澤 川 11 森 根

6. 添附書類の目録

(1) 明細書 1通

(2) 図面 1通

(3) 委任状及び同意書 各1通(署名)

(4) 優先権主張証明書及び抄訳文 各1通(追って補正する)

明細書

1. 発明の名称

移植片調製方法

2. 特許請求の範囲

(1) 移植組織として使用し、該組織に実質的に感染抵抗を付与することを目的として、同一又は異なる種から得られた組織の抗原性を減少せしめる方法に於いて、該組織を適切なpHの水性溶液中のグルタルアルデヒド(GA)溶液内で処理することを特徴とする移植片調製方法。

(2) 前記処理がGAの0.3~1.0%溶液中で効果的になされることを特徴とする特許請求の範囲第(1)項に記載の方法。

(3) 前記処理が7~20分間で効果的になされることを特徴とする特許請求の範囲第(1)項又は第(2)項に記載の方法。

(4) 遊離GAを除去するべく、続いて該組織を洗浄することを特徴とする特許請求の範囲第(1)項

①日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 51-124094

④公開日 昭51.(1976)10.29

②特願昭 51-40822

②出願日 昭51.(1976)4.9

審査請求 未請求 (全7頁)

庁内整理番号

6829 54

7043 44

7043 44

②日本分類

94 H0

30 G125.1

30 H9

⑤Int. Cl²

A61F 1/24

A61K 31/11

~第(3)項に記載の方法。

(5) GA処理の後、該組織を適当なアミノ酸又はアミンと反応させて結合GAの遊離官能基を閉塞することを特徴とする特許請求の範囲第(1)項~第(4)項に記載の方法。

(6) GA処理の後、該組織をその表面特性を変性するべく適合し得る試薬を用いて処理することを特徴とする特許請求の範囲第(1)項~第(4)項に記載の方法。

(7) 負又は正の電荷が該表面に付与されることを特徴とする特許請求の範囲第(6)項に記載の方法。

(8) 該組織表面に疎水性部分が付与されることを特徴とする特許請求の範囲第(6)項に記載の方法。

(9) 該組織が皮膚であることを特徴とする特許請求の範囲第(1)項~第(8)項に記載の方法。

(10) 該皮膚が同一種よりなる同質異体移植片であるか又は異なる種よりなる異質移植片であることを特徴とする特許請求の範囲第(9)項に記載の

として予処理された組織。

方法。

- (11) 該組織が血管であることを特徴とする特許請求の範囲第(1)項～第(9)項に記載の方法。
- (12) 実質的に前記され且つ実施例に記載されている組織の抗原性を減少するための方法。
- (13) 移植組織として使用されることを目的とし、 α Aを用いて予処理される組織。
- (14) α Aを用いて予処理された皮膚であることを特徴とする特許請求の範囲第(13)項に記載の組織。
- (15) α Aを用いて予処理された後、ジカルボン酸で処理された血管であることを特徴とする特許請求の範囲第(13)項に記載の組織。
- (16) 該組織が α Aで処理され、水性媒体の α A希釈溶液中に保存され、移植組織として使用されることを特徴とする組織を長期間に亘つて保存する方法。
- (17) 実質的に前記したことを特徴とする移植組織

3. 発明の詳細な説明

本発明は、組織適合上の障害を克服し、更に受体に於いて長期にわたつて有効であり且つ感染に対する抵抗力が強く受体に好ましくない影響を実質的に与えない移植片の提供を可能にすべく、例えば火傷、創傷、潰瘍及び皮膚片の剥離の場合等に適用され得る生物学的治療用移植片調製方法に係る。

組織移植に於いて遭遇する主な障害は、移植組織の免疫的拒否である。この拒絶反応は、「非自」抗原に対する生体の固有免疫反応に加えて、受体の細胞と移植組織との間の抗原差にも起因する。実験モデル及び臨床に於いて同質異体移植片及び異質移植片の生存期間を延長しようとする試みは、従来主として受体の免疫機能を抑制することを目

途成されてきた。しかしながら、一般化されている免疫抑制は好ましくない副作用、感染に対する抵抗力の弱化、ヘモポエチン幹細胞のレベル低下を伴う。他の可能性は、移植片の生物学的機能を維持した状態で該移植片の抗原性を減衰させるか又は完全に除去することである。この方法の利点は受体の免疫能力が影響されないことである。ところがこの方針に沿つての研究は多くの場合不成功であつた。ほとんどの研究は動物に関して行なわれ、最近になつて漸く臨床的に評価され始めた。実験用動物を用いて同質異体移植片又は異質移植片をコーチゾン、サリドマイド又はウレタンにより試験管内で処理するとそれらの生存期間が約2倍に延長された。この皮膚に対して局部的に適用した薬剤の量は、該薬剤を全身注射することにより同一効果を得るために必要な量よりも少なかつた。移植片の抗原特性を変性する為、供与体の皮膚はストレプトキナーゼ/ストレプトドルナー

ゼ又は受体のRNA及びDNA製剤によつて試験管内で処理されていた。供与体の皮膚が受体の移植抗原を受けても同質異体移植片の保持期間は延長されなかつた。フォルマリン又はシアン化物による試験管内処理又は凍結乾燥により蜂窩生育力が破壊された移植片に対しては、最小の免疫反応が観察された。活動を停止した移植片の大部分は一定期間受体によつて保持された。

(以下 余 白)

酵素フアイシンの1%溶液により処理し、次にジアルデヒド酸の1.5%溶液により18時間処理し、更に無菌状態にするため50%エタノール及び1%プロピレン酸化物を含有する溶液中に保存した血管異質移植片が、実験用動物を用いて試験され、受近になつて漸く損傷された血管を交換するために臨床的に使用されるようになった。この数年来、火傷治療に於ける一時的手当として凍結乾燥されたぶたの皮膚の異質移植片が使用されている。これら移植片は抗原性が極めてわずかであるか又は全く見出されないものであるが、該移植片が癒着され感染される以前にこれを2~4日毎に取り換える必要がある。

本発明の目的は、移植片の生物学的機能にとつて好ましく且つ移植片が感染に対して抵抗し得るような処置法を提供することにある。感染及びその他の特性に対する抵抗力の強化により「バンク」の設立が可能となり得る。即ち該「バンク」に於

状況のもとで組織成分中に存在する官能基と反応し得る。遮蔽作用の程度と性質とは、適当な試薬を選択使用することによつて調節され得る。更に、化学的不活性分子も同様に2官能試薬によつて組織と結合され得る。この方法のその他の特徴は、移植組織の表面上に新たな特性(例えば、正又は負の帯電、疎水基等)を生成し得ることである。移植組織上に於ける新たな接触面を形成する特別の処理を施すことにより、受体による移植組織の受容を容易となし且つ移植組織を生理的に機能し易くする。数種の化学試薬を選別した結果、蛋白質を急速且つ効果的に架橋し得る2官能試薬であるグルタルアルデヒド(GA)を詳細に研究する為選んだ。

GAは組織に於ける蛋白質を架橋させる。従つて架橋蛋白質は屈曲可能となるために蛋白質裂開に対する抵抗が強化される。細菌が組織を破壊する主要作用は、細菌の酵素活動の結果である。強

いては、大量の処理済みの組織が長期間保存され得、後に患者に対して適用する場合にもそれらの効能が著しく失なわれることはない。開発された方法は、同質異体移植片と異質移植片との両者に対して相等しく有効に利用され得る。異質移植片の使用は、人体からの組織の供給に限りがあることから生じる幾多の困難を克服する。本発明は更に、移植片として使用されるべきこのような予め処理済みの組織に係る。本発明のその他の特徴は以下の説明により明らかとなるであろう。

本発明は、同質異体移植片又は異質移植片がある種の化学試薬により試験管内で処理されるならば、該試薬の反応基が組織適合抗原分子と直接結合及び共有結合するか又は相互接近する結果、組織適合抗原は遮蔽され受体の免疫系に接近し難くなる、という仮説に基づいている。この方法の目的は、組織拒絶の原因となる抗原の機能的除去を達成することにある。多くの化学試薬は、生理的

同質異体の非屈曲性は酵素加水分解を促進する為、GA処理を施された皮膚は感染に対する抵抗力が強化されると推定され得るが、実際抵抗力は強化された。このことは、多くの傷が感染されていることから傷の治療に於ける重要な特性である。

本発明による方法は、あらかじめ決められた強度のグルタルアルデヒド溶液により皮膚のような組織を直接処理(酵素の処理を行わない処理)することから成る。0.5~1重量%グルタルアルデヒドの0.1%重炭酸ナトリウム溶液又は0.3~1重量%グルタルアルデヒドの0.01モルpH7.3磷酸塩緩衝液--0.15モル塩化ナトリウム(PBB)溶液が適当であると判明した。pHの適当値は広範囲にわたる。GAによる組織の処理は4~12のpHで可能であつた。好ましい範囲は6.5~9である。該組織を7~20分間該溶液中に維持し、その後使用するに先立つて、アミノ酸又はその他の適当な試薬を含有するPBB溶液又は重炭酸ナ

トリウム溶液を用いて該組織を洗浄し余分のグルタルアルデヒドを除去することにより、G A の残留反応基を閉塞し該組織の面特性を変性する。

グルタルアルデヒド (G A) 処理された移植片の長所は、抗原性が検出されず、感染に対する抵抗力が強く、更に長期間受体上に保持されることである。動物実験では、G A 処理された皮膚の同質異体移植片及び異質移植片は約 100 日間迄 (凍結乾燥されたぶたの皮膚では 12.8 日間) 保持され、この間感染の徴候は全く見られなかつた。火傷した患者の治療用として臨床的に使用した場合、G A 処理された同質異体移植片は 21.8 日間傷床に保持された。G A 処理された移植片が感染に対して強い抵抗力を保有しているのは、G A が強力なる架橋剤であるという事実に起因する。G A は即座に蛋白質中のアミノ基と反応し、またこの形成された結合は極めて安定なものである。従つて、G A 処理された移植片中の蛋白質は架橋

され且つ「固定」される。蛋白質分解活動が蛋白質基質の非屈曲性によつてかなりの程度促進せられるということは周知である。架橋蛋白質に於いては、この非屈曲作用が著しく妨害される筈である。従つて、G A 処理された移植片中の架橋蛋白質では、感染した傷に於ける細菌又は損傷した組織が放出する蛋白質分解酵素によつて消化及び溶解され難くなると想像される。この点は次の実験に於いて例証される。

(以下 全 日)

各種菌 (例えば、大腸菌、ゾドウ球菌、ソノイドモナス菌) は 10^2 菌/ml 含有する溶液中に浸した皮膚を容易に且つ不可抗的に感染する。一方、1% G A 中で処理された皮膚がこれらの菌を溶びる場合には、この G A 処理された皮膚が著しく感染されるのには更に数多くの菌 ($10^4 \sim 10^6$ 菌/ml) が必要とされる。更に 1% G A 溶液は、皮膚上で強力な殺菌活動を行う。正常な皮膚は不均質集団の菌を保有しており、このことは、正常な皮膚をこの不均質集団菌に浸すと無菌培養地は感染されるという事実により明白である。一方、以上の方法により、あらかじめ 1% G A 中で処理された皮膚上には菌は検出されない。

次に実施例について詳述する。

グルタルアルデヒド処理された皮膚の同質異体 (マウス、ラット、モルモットからの) 移植片及び異質移植片を用いて得られた結果は、これら移植片が、保持時間、肉眼検査、検鏡及び移植片の抗原性に対する分析から推定される通り

の作用を行うことを示した。G A 処理された移植片は、長期間保持された (処理されていない移植片と比較して 6 倍以上の増加である。表 1 参照)。

FB B 1 ml 当り 3 ml のグルタルアルデヒドを含有する溶液の中に浸し、室温で 20 分間該溶液中に維持し、次に FB B により 4 回洗浄を繰り返して遊離グルタルアルデヒドを除去した皮膚移植片についての結果が表に示されている。こうして処理された皮膚は受体に適用され、ワセリンガーゼと焼石膏とにより被覆され、10 日後にワセリンガーゼと焼石膏が除去される。G A 処理された移植片は、受体に強固に結合されている。該移植片は当初柔軟であり、次第にほとんど収縮することなく硬化して、感染されない状態が維持される。組織学によると、移植片は生着せず G A によつて固定され、更に駆血されても皮膚の一般的構造 (エピデルミン、付属物及び真皮) は約 3 ヶ月間保持される。G A 処理された同質異体及び異質移植片

の抗原性は、極めて弱く、実質的に検出され得ない。該移植片は細胞毒抗体を形成せず、又処理されていない同質異体移植片によつて感作された動物は、正常な感作されていない受体と同様に、Q A処理された同質異体移植片を保持する。Q A処理された同質同体移植片は、Q A処理された同質異体及び異質移植片と同様に作用し且つ拒絶されるという事実も又移植免疫の欠乏を示すものである(表1参照)。検鏡によれば、Q A処理された移植片の拒絶メカニズムは、不活性異体の拒絶メカニズムと同一である。

Q A処理された皮膚が、長期間観察しても感染されない状態を維持したということは、極めて印象的なことである。これは多分Q Aによる皮膚成分の架橋作用に起因する。プロテアーゼが、屈曲期に凝結された架橋蛋白質よりも非屈曲性蛋白質をより急速に分解するということは周知である。この点を更に研究する為に、Q A処理された皮膚

が感染に対する抵抗力を強化するという事実とによつて、Q A処理された組織をその機能を著しく損失することなく長期間保存することが可能となる。実際、Q A処理された組織は6週間保持され、この後の使用も成功した。このことは、連続使用され得るQ A処理後組織の「バンク」を設立する可能性を暗示する。

保持期間の著しい長期化及びQ A処理皮膚の特性により、非生育的傷病被覆としてのQ A処理皮膚移植片の臨床使用は評価され得る。この研究は全身の皮膚の15~50%の火傷患者21人に試された。各々の患者がQ A処理及び未処理の死体皮膚の同質異体移植片を受容した。Q A処理移植片の平均保持期間は明らかに延長した。即ち未処理移植片の10.9日に対して21.8日であった。Q A処理同質異体移植片の適用後1ヶ月ですでに受体部位は健康であることが判明し、全てのケースに於いて良好な自己移植が得られていた。臨床

の菌侵入に対する感受性の試験を行なつた。そしてQ Aが皮膚上の菌を殺滅するという結果を得た。更に、Q A処理された皮膚が各種の菌(例えばブドウ球菌、ブソイドモナス菌等)を集中して浴びる場合、Q A処理された皮膚がわずかに感染するに処理されていない皮膚が広範囲に感染するより10,000倍の菌の集中を必要とする。

Q A処理された移植片は生育力がない。しかしながら活動を停止した移植片の全てが生育力を持たない訳ではない。凍結乾燥された移植片は10~13日間延長して保持された。シアン化物処理された同質異体移植片に於いては、期間の延長は観察されず、処理されていない生育性同質異体移植片より一層急速に取壊した。一方、Q A処理された移植片については、わずかに収縮は見られたが、保持期間は著しく延長された(表1)。

処理された移植片の組織学上の特徴と、Q Aが皮膚を殺滅するという事実と、処理された移植片

の活況及び識別血球肝臓による判定により、どの患者にも母体の影響はみられなかつた。アレルギー反応の欠如を示す明白な好酸球増多症も検出されなかつた。

人間の患者に移植片を適用する場合、Q A処理皮膚はQ Aの分泌遊離官能を除去するための予防処置としてアラニンで処理される。該処置は任意であり、Q A溶液に浸漬後の皮膚が完全に洗浄される場合は必要でないと考えられる。

皮膚は極めて高抗酸成分を有する組織の一つであるために、結果として本発明方法は確かに他の組織又は器官に対して少なくとも良好な結果を示すであろうと予想され、その場合、組織適合性の問題はほとんど発現しない。従つてグルタルアルデヒドを用いる処理方法は損傷血管を代用するための血管の如き他の組織に対してもまた適切であることは明白である。この場合、グルタミン酸、アスパラギン酸又は他の適当なジカルボン酸試薬

はQ Aを介して移植組織として用いられる血管表面に結合されるであろう。従つて負に帯電した表面が生成され、これにより凝血が減少することは知られている。凝血は血液流の閉塞を伴つて血栓を形成し易いが、血管の移植組織の一般的併発症であることは周知であるが、前記処理によつて大部分は克服されることができると見られる。

腸、血管、食道の如き筒状器官は、食道、血管又は胆管の損傷部位に置換するべく使用され得る。これらの場合の有利な点は、Q A処理物質が感染抵抗（感染は食道及び胆管移植組織の通常の併発症である）の顕著な増大を示すことであり、実際にQ A処理物質は受体から血液凝集元素により容易に浸透される。Q A処理皮膚は火傷のみでなく損傷腸の移植又は横隔膜ヘルニア等特殊な奇形を閉鎖するためにも用いられ得る。

処理工程は採集材料を無菌生理食塩水を用いて洗浄することにより開始される。洗浄後、材料を適当な大きさの切片に切断し、この切片を次の処理中に折り重なることのないように支持体に付着させる。該支持体は前記切片が移植片として実際に使用されるまで存続するか又は切片がバックされるまで残存して除去されて再び使用され得るようなタイプのものであればよい。結局は、処理工程を実施するための準備的役割を担う支持体を用いられるとよい。すべての場合、如何なる支持体を用いられ、支持体に適用された後支持体と皮膚切片との組合せは無菌生理食塩水による再度の洗浄に付される。

現段階でなされるべき処理は無菌状態下でなされねばならない。工程の主要な段階は一定のpHで切断片をグルタルアルデヒド溶液により処理することである。この処理は溶液への浸洗又は浸漬により遂行されるか又は材料の切片上に密接する

組織の表面特性の定性はもちろん意図された使用法に従う。即ち受体に於いて移植片を最適な機能せしめるために、組織の表面は正又は負の電荷を有する基を備えるべく定性することが有利である。このために適当なアミノ酸又は重合体を用いるか又は荷電官能基の生理学的受容源を付着させると効果的である。

組織の表面特性は又表面を疎水性又は親水性とすることにより定性され得る。疎水性表面にするにはフェニルアラニンを用い、親水性にするためにはセリンとグルタミン酸又はリジンをを用いて調整せしめると効果的である。このような定性には種々の試薬が使用され得るが、移植される組織の所要特性に従つて選ばれるであろう。

移植組織材料の好ましい調製方法の第1段階に於いて移植片調製用の材料を供与体から採集し、無菌生理食塩水で洗浄して次の処理まで冷蔵状態に貯蔵する。

ように溶液を直接通過せしめて遂行されてもよい。

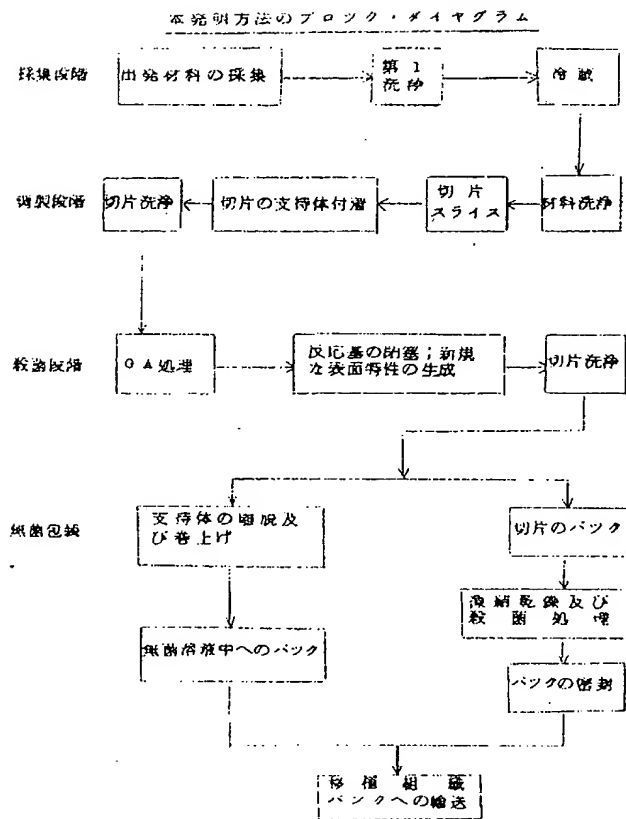
処理に於いてこの主要な段階を経た後、材料は適当なpHでアミンとともに食塩水処理されて切片から反応基を遊離し、所望により移植片に所望の表面特性を導入する。この後半の処理もまた切片を溶液中に浸洗又は浸漬するか切片上に溶液を直接流通せしめて行われ得る。

最終段階は、再度切片を無菌生理食塩水又は単に蒸留水を用いて洗浄することより成る。

上記一連の処理を実施した皮膚切片は食塩水中又は乾燥状態で提供されてもよい。溶液中の状態を所望の場合は、皮膚切片を支持体から離し分割移植片を介在させて巻き上げる。巻かれた皮膚切片は密閉容器内で無菌溶液（グルタルアルデヒドの1種であつてもよい）中に収置する。乾燥状態を所望の場合は一部密閉容器-支持体を伴うか又は伴わず-内に乾燥し、凍結乾燥、殺菌処理に付し、その密閉容器を完全に密封する。

添付のフローシート（プロットダイアグラム）
は前記した工程を示し、更に説明を要するもので
はない。

（以下 余 白）



7. 前記以外の発明者、特許出願人または代理人

(1) 発 明 者

(2) 特 許 出 願 人

(3) 代 理 人

東京都新宿区三光町2番16号 明光ビル

電話東京 (03) 354-8623 (郵便番号 160)

17027 弁護士 宮 田 広 隆